

09/889313

JCN Rec'd PCT/PTO 11 JUL 2001

EXPRESS MAIL CERTIFICATE

Date 7/11/01 Label No. 4706744638US

I hereby certify that, on the date indicated above, I deposited this paper or fee with the U.S. Postal Service and that it was addressed for delivery to the Commissioner of Patents & Trademarks, Washington, DC 20231 by "Express Mail Post Office to Addressee" service.

DBPek
Name (Print)

[Signature]
Signature

File No.: 4703/OJ586US0

DARBY & DARBY P.C.

805 Third Avenue
New York, NY 10022
212-527-7700

Date: July 9, 2001

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

In Re Application of: KITAMURA et al.

Serial No: To be assigned
(U.S. National Phase of
International Application No. PCT/JP00/00068
Filed: 11 January 2000)

Filed: Concurrently herewith

For: PROCESS FOR PRODUCING FERMENTED MILK CONTAINING
ANGIOTENSIN CONVERTING ENZYME INHIBITORY PEPTIDE
AND PROCESS FOR PRODUCING MILK SERUM

AFFIRMATION OF PRIORITY CLAIM

Hon. Commissioner of
Patents and Trademarks
Box PCT
Washington, DC 20231
Attn: DO/EO/US

Sir:

Priority has been claimed on the basis of Japanese Patent Application

No: 11/3946, filed 11 January 1999.

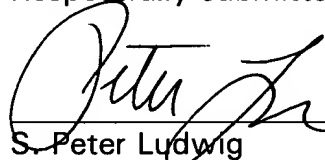
THIS PAGE BLANK (USPTO)

Hon. Commissioner of
Patents and Trademarks
July 9, 2001
Page 2

A Certified copy of the aforesaid Japanese Patent Application was received by the International Bureau on 14 February, 2000, during the pendency of International Application No. PCT/JP00/00068.

Applicant herewith affirms the priority claim of the aforesaid Japanese patent application under U.S.C. §119.

Respectfully submitted,



S. Peter Ludwig
Reg. No. 25,351

DARBY & DARBY P.C.
805 Third Avenue
New York, New York 10022
212-527-7700

THIS PAGE BLANK (USPTO)

09/889313
58

PCT/JP 00/00068
27.01.00

日 本 国 特 許 庁

PATENT OFFICE
JAPANESE GOVERNMENT

REC'D 14 FEB 2000

WIPO PCT

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日

Date of Application:

1999年 1月11日

出 願 番 号

Application Number:

平成11年特許願第003946号

出 願 人

Applicant(s):

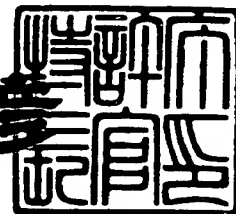
カルピス株式会社

**PRIORITY
DOCUMENT**
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

2000年 1月14日

特許庁長官
Commissioner,
Patent Office

近藤 隆彦



出証番号 出証特平11-3093160

【書類名】 特許願

【整理番号】 P99-006

【提出日】 平成11年 1月11日

【あて先】 特許庁長官殿

【発明者】

 【住所又は居所】 東京都町田市中町2丁目18番8号 ベルメゾン町田
 201

 【氏名】 北村 修二

【発明者】

 【住所又は居所】 神奈川県川崎市高津区梶ヶ谷4丁目1番2号 ジュネ
 ス梶ヶ谷405

 【氏名】 上山 崇

【特許出願人】

 【識別番号】 000104353

 【氏名又は名称】 カルピス株式会社

【代理人】

 【識別番号】 100081514

 【弁理士】

 【氏名又は名称】 酒井 一

【手数料の表示】

 【予納台帳番号】 007010

 【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

 【物件名】 明細書 1

 【物件名】 要約書 1

 【包括委任状番号】 9704194

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 アンジオテンシン変換酵素阻害ペプチド含有発酵乳の製造法及び乳清の製造法

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 乳を含む原料を、攪拌しながら乳酸菌発酵させ、アンジオテンシン変換酵素阻害ペプチドを生成させる工程を含むアンジオテンシン変換酵素阻害ペプチド含有発酵乳の製造法。

【請求項 2】 乳を含む原料を、攪拌しながら乳酸菌発酵させ、アンジオテンシン変換酵素阻害ペプチド含有発酵乳を得る工程と、得られた発酵乳を遠心分離及び／又は圧搾濾過し、乳清を分離回収する工程とを含むアンジオテンシン変換酵素阻害ペプチド含有乳清の製造法。

【請求項 3】 アンジオテンシン変換酵素阻害ペプチドが、Val Pro Pro、Ile Pro Pro及びこれらの混合物からなる群より選択される請求項 1 又は 2 に記載の製造法。

【請求項 4】 乳酸菌発酵を、乳酸菌と酵母とを用いて発酵させることを特徴とする請求項 1 又は 2 に記載の製造法。

【請求項 5】 乳酸菌が、ラクトバチルス・ヘルベチカス (*Lactobacillus helveticus*) を含む請求項 1～4 のいずれか 1 項に記載の製造法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、Val Pro Pro 及び／又は Ile Pro Pro等のアンジオテンシン変換酵素阻害ペプチドを含有する発酵乳を効率良く製造できるアンジオテンシン変換酵素阻害ペプチド含有発酵乳の製造法、及びアンジオテンシン変換酵素阻害ペプチドを含有する乳清を効率良く分離製造し得るアンジオテンシン変換酵素阻害ペプチド含有乳清の製造法に関する。

【0002】

【従来の技術】

アンジオテンシン変換酵素 (Angiotensin Converting Enzyme, 以下 “ACE”

と称する)は、主に肺や血管内皮細胞に存在する。このACEは、レニンにより分解されたアンジオテンシン I (Asp Arg Val Tyr Ile His Pro Phe His Pro Phe His Leu)に作用してC末端よりジペプチド(His Leu)を遊離させ、血管壁平滑筋を収縮させる作用を示すと共に、強力な血圧上昇作用を有するアンジオテンシン IIを産生する。また、この酵素は、降圧作用を有するブラジキニンを分解し、不活性化作用を併せ持つ。このようなACEは、昇圧ペプチド(アンジオテンシン II)を産生すると共に、降圧ペプチド(ブラジキニン)を不活性化するので、結果として血圧を上昇させる作用を示す。従って、ACEの活性を阻害するアンジオテンシン変換酵素阻害剤(Angiotensin Converting Enzyme Inhibitor, 以下“ACEI”と称する)は、血圧上昇を抑制する作用を示す。

【0003】

ACEIとしては、Val-Pro-Proを構成単位として有するアミノ酸残基数が3～10個のペプチド(特許第2782142号公報)及びIle-Pro-Proのトリペプチド(特開平3-120225号公報)等が知られている。更に、乳カゼインの乳酸菌産生タンパク質分解酵素で分解されることによって生成し、発酵乳の乳清に溶解して存在するACEI活性を持つペプチドも知られている(J.Dairy Sci. 78, 6, p1253-1257, 1995)。

このようなACEIとしてのペプチドを摂取する場合、例えば、Val-Pro-Pro及び／又はIle-Pro-Proを含む発酵乳をそのままの形態で摂取することができる。しかし、発酵乳中に存在するACEIとしてのペプチドの濃度及び有効量を考慮した場合、ある程度以上の量の発酵乳を摂取することが必要である。このため、ACEIを多く含む発酵乳や乳清の製造法の開発が望まれている。

Val-Pro-Pro及び／又はIle-Pro-Pro等のACEIは、安全性が高く医薬品、機能性食品、健康食品等に利用できることが知られている。これらVal-Pro-Pro及び／又はIle-Pro-Proの製造法としては、これらを構成単位として含むペプチド及び／又は蛋白質を含む培地において乳酸菌を培養し、発酵乳を得、得られた発酵乳を精製する方法(特許第2782153号公報)が提案されている。

【0004】

従来の乳酸発酵の方法は、例えば、ヨーグルト等の代表的な発酵乳製品の製造

の場合、静置状態で行なわれている。このような静置状態で乳酸発酵が行なわれる要因は、乳酸発酵時の乳酸菌の増殖により pH が低下している状態において、発酵液に攪拌、振盪等の振動が加えられると、得られる発酵乳製品において、離水及びテクスチャー不良等の問題が生じるためであると考えられる。また、乳酸発酵に用いる乳酸菌は、通性嫌気性細菌に属するために、しばしば酸素により生育が阻害される。従って、従来、攪拌培養することは全く考慮されていないのが実状である。一方、チーズ製造の場合も、静置状態で発酵が行なわれた後、静置状態でレンネットを作用させてカゼインを凝固させ、その後、攪拌や圧搾を行なって乳清を排出する方法が一般的である。

ところで、発酵乳から乳清を精製し、この乳清に含まれる有効成分を濃縮するには、乳清の回収率向上策が工業化のために必要である。従来、発酵乳からカード画分を回収することを目的とする方法は多数提案されているが、発酵乳から乳清を効率的に分離する方法については、これまでほとんど行なわれていないのが現状である。

【0005】

【発明が解決しようとする課題】

従って、本発明の目的は、安全性が高く、医薬品、機能性食品、健康食品等として使用できる ACEI ペプチドを高い割合で含む発酵乳及び乳清を高回収率で効率的に得ることができる ACEI ペプチド含有発酵乳及び乳清の製造法を提供することにある。

【0006】

【課題を解決するための手段】

すなわち、本発明によれば、乳を含む原料を、攪拌しながら乳酸菌発酵させ、アンジオテンシン変換酵素阻害ペプチドを生成させる工程を含むアンジオテンシン変換酵素阻害ペプチド含有発酵乳の製造法が提供される。

また本発明によれば、乳を含む原料を、攪拌しながら乳酸菌発酵させ、アンジオテンシン変換酵素阻害ペプチド含有発酵乳を得る工程と、得られた発酵乳を遠心分離及び／又は圧搾濾過し、乳清を分離回収する工程とを含むアンジオテンシン変換酵素阻害ペプチド含有乳清の製造法が提供される。

【0007】

【発明の実施の形態】

以下本発明を更に詳細に説明する。

本発明のACEIペプチド含有発酵乳の製造法では、乳を含む原料を、攪拌しながら乳酸菌発酵させ、ACEIペプチドを生成させる工程を必須の工程として含む。

【0008】

原料として用いる乳としては、例えば、牛乳、山羊乳、羊乳等の獣乳；豆乳等の植物乳；これらの加工乳である脱脂乳、還元乳、粉乳、コンデンスミルク等が用いられる。これらの乳には、Val Pro Pro及び／又はIle Pro Proを構成単位として含むペプチド及び蛋白質が含まれる。

乳の固形分濃度は特に限定されないが、例えば、脱脂乳を用いる場合の乳固形分濃度は、9重量％程度が発酵乳の生産には最も良く用いられる。しかし、設備あたりの生産量を考慮した場合、乳固形分濃度をある程度高くしたほうが生産コストを抑えることができる。通常の静置下における乳酸発酵において、乳固形分濃度を13重量％以上として乳酸発酵を行なうと、得られる発酵乳の粘度が高くなり、乳清を分離することが困難となるため、乳固形分濃度を高くすることができない。これに対して、後述する本発明の方法では、乳酸発酵を攪拌しながら行なうため、乳固形分濃度を15重量％以上にする場合にも、低い粘度が保持されて容易に、且つ効率的に乳清を得ることができる。

本発明の製造法では、本発明の目的を損ねない範囲で、乳以外の他の原料を含む有させることも可能である。他の原料は、通常、発酵乳の製造に使用できる公知の他の原料から所望の目的に応じて適宜選択することができる。

【0009】

本発明の製造法において、乳酸菌発酵させる際に用いる乳酸菌としては、ラクトバチルス属の乳酸菌等が好ましい。このような乳酸菌としては、例えば、ラクトバチルス・ヘルベチカス(Lactobacillus helveticus)、ラクトバチルス・デルブルキ・サブスピーシーズ・ブルガリカス(Lactobacillus delbruekii subsp. bulgaricus)、ラクトバチルス・アシドフィラス(Lactobacillus acidophilus)

等が挙げられる。特に、ラクトバチラス・ヘルペティカスCM4株(工業技術院生命工学工業技術研究所 寄託番号:FERMBP-6060, 寄託日1997.8.15)(以下、ラクトバチラス・ヘルペティカスCM4株と称す)が、ACEIペプチドの高生産乳酸菌として好適である。

本発明において乳酸菌は、あらかじめ前培養しておいた十分に活性の高いスターターとして用いることが好ましい。初発菌数は、好ましくは $10^5 \sim 10^7$ 個/ml程度である。

【0010】

本発明において、上記乳酸菌発酵を行なうにあたり、本発明の目的を損ねない範囲で他の菌を含有させることもできる。例えば、得られる発酵乳や乳清を、機能性食品、健康食品等として利用する場合に、風味を良好にし、嗜好性を良好とするために酵母を併用することができる。

酵母の菌種は特に限定されないが、例えば、サッカロマイセス・セレビシェ(*Saccharomyces cerevisiae*)等のサッカロマイセス属酵母等が好ましく挙げられる。酵母の含有割合は、その目的に応じて適宜選択することができる。

【0011】

本発明の製造法において、乳酸菌発酵させる際の発酵濃度及び発酵終了酸度は、乳酸菌種、菌株及び乳固形分含有量により最良の条件が異なるので、ACEIペプチドの生成量により至適条件を適宜設定することができる。例えば、ラクトバチラス・ヘルペチカスCM4株を用いる場合の至適温度は34℃、発酵時間は24～30時間程度である。発酵終了酸度は、乳酸酸度として1.5～3重量%程度が好ましい。

【0012】

本発明の製造法においては、前記乳酸菌発酵を攪拌しながら行なう。この攪拌は、乳酸菌発酵中に連続的に行なうのが最も好ましいが、必ずしも連続的攪拌に限定されるものではなく、乳酸菌発酵中に攪拌操作が行なわれれば良い。乳酸菌は、通性嫌気性細菌に属するため、その生育が酸素により阻害されないようにすることが好ましい。従って、攪拌は、発酵液中に実質的に気泡が巻き込まれない程度に、発酵液が緩やかに流動混合するような低速度攪拌が好ましい。このよう

な実質的に気泡を巻き込まない低速度の攪拌を行なうことにより、ACEI ペプチドを高い割合で含む発酵乳を効率的に得ることができ、また、このような発酵乳から後述する方法により、効率的に乳清を得ることができる。

【0013】

前記攪拌の条件は、乳酸菌発酵を行なうための発酵タンクの形状、攪拌機の形状等を考慮して適宜選択することができる。例えば、攪拌速度は、1～50 rpm 程度の低速攪拌が好ましい。このような低速攪拌を行なうことにより、発酵終了までの時間は、静置状態で発酵させた場合に比較して若干(2～3時間)長くなるが、驚くべきことに、ACEI ペプチドの発酵液中の濃度は高くなることが新たに見出された。

【0014】

本発明のACEI ペプチド含有乳清の製造法では、前記発酵乳を得る工程の後、得られた発酵乳を遠心分離及び／又は圧搾濾過し、乳清を分離回収する工程を含む。

発酵乳を遠心分離するには、遠心分離機を用いて行なうことができる。遠心分離の条件は、例えば、回転数2000～10000 rpm 程度において、連続遠心分離することが好ましい。一方、圧搾濾過は、圧搾濾過機を用いて行なうことができる。圧搾濾過の条件は、2～8 kg/cm²の加圧条件とするのが好ましい。

【0015】

本発明の製造法により得られるACEI ペプチド含有発酵乳又は乳清は、発酵乳飲料又は乳清飲料として用いることができる。また、ACEI ペプチド含有乳清を、脱酸、脱塩、濃縮、単離等の処理工程を経た後に液状製品として、若しくは乾燥・粉末化して顆粒状、錠剤等の製品として用いることができる。

【0016】

【発明の効果】

本発明のACEI ペプチド含有発酵乳の製造法では、攪拌しながら乳酸菌発酵させる工程を含むので、ACEI ペプチドを高い割合で含む発酵乳を効率良く得ることができる。また、本発明のACEI ペプチド含有乳清の製造法では、攪拌

しながら乳酸菌発酵させて発酵乳を得る工程と、得られた発酵乳を遠心分離及び／又は圧搾濾過して乳清を分離回収する工程を含むので、ACEIペプチドを高い割合で含む乳清を効率的に回収することができる。従って、本発明のこれらの方法を利用することにより、ACEIペプチドを含む製品を容易に製造することができ、工業的にも極めて有効である。

【0017】

【実施例】

以下実施例及び比較例により、本発明を更に詳細に説明するが、本発明はこれらに限定されるものではない。

【0018】

比較例 1

脱脂粉乳(よつ葉乳業(株)製)900gを、水9100gに溶解し、90℃で1分間HTST(High Temperature Short Time)殺菌した。その後、室温まで冷却して予め前培養しておいたラクトバチルス・ヘルベティカスCM4株を300g接種し、34℃、25時間静置発酵させ、乳酸酸度が2.06重量%の発酵乳aを得た。

次に、得られた発酵乳aを遠心分離機(日立製作所(株)製、20PR52)を用いて、3000rpm、10分間の条件で、カード画分を遠心分離により除去し、乳清2.5kgを回収した。

【0019】

得られた発酵乳aについて、下記の条件で粘度及びACEIペプチド含有量を測定した。結果を表1に示す。

(粘度の測定法)

粘度の測定には、ピストロン粘度計(芝浦システム(株)製)を用いた。粘度測定時の液温は25℃、回転数は60rpmとし、ローター及び測定時間は、中粘度用ローターNo. 2を用いて、測定時間60秒で行なった。

(Val Pro Pro及びIle Pro Pro含有量の測定法)

発酵乳a約1mlをそのまま15000rpmで10分間実験用遠心分離機にて上清を回収する。得られる上清0.3mlをSep-Pak Cartridge(ウォーターズ

社製)に吸着させ、蒸留水で洗浄する。メタノール 5 ml にて溶出し、遠心処理下で減圧、乾燥する。乾燥物を 0.3 ml の 0.05% Trifluoroacetic acid 水溶液に溶解し高速液体クロマトグラフィー (HPLC) により分析する。

HPLC による分析条件

使用機種: 日立 L4000 UV デテクター (215 nm 検出)

L6200 インテリジェントポンプ

L5030 カラムオープン (35℃)

分離条件: 流速 0.5 ml/min

溶離液: 0.3 M NaCl, 0.05% Trifluoroacetic acid 水溶液

カラム: Asahipak GS320 (Φ 3.9 × 600 mm)

ACE I ペプチド含有量: Val Pro Pro と Ile Pro Pro の ACE I 活性が異なるため、下式にて換算し、ACE I ペプチド含有量とした。

ACE I ペプチド含有量 (mg/100g) = IPP 量 (mg/100g) × 1.7 + VPP 量 (mg/100g)

【0020】

実施例 1

脱脂粉乳 (よつ葉乳業 (株) 製) 900 g を、水 9100 g に溶解し、90℃ で 1 分間 HTST 殺菌した。その後、室温まで冷却して予め前培養しておいたラクトバチルス・ヘルペティカス CM4 株を 300 g 接種し、34℃ で攪拌速度 50 rpm にて攪拌しながら 29 時間発酵させ、乳酸酸度が 1.88 重量% の発酵乳 b を得た。

次に、得られた発酵乳 b を遠心分離機 (日立製作所 (株) 製、20PR52) を用いて、3000 rpm、10 分間の条件で、カード画分を遠心分離により除去し、乳清 6 kg を回収した。

得られた発酵乳 b について、比較例 1 と同様な条件で粘度及び ACE I ペプチド含有量を測定した。結果を表 1 に示す。但し、粘度測定におけるローター及び測定時間は、低粘度用ローター No. 1 を用いて測定時間 30 秒で測定した。

【0021】

比較例 2

脱脂粉乳(よつ葉乳業(株)製) 1.5 kg を、水 8.5 kg に溶解し、90℃で1分間HTST殺菌した。その後、室温まで冷却して予め前培養しておいたラクトバチルス・ヘルペティカスCM4株を300g接種し、34℃で28時間静置発酵させ、乳酸酸度が2.81重量%の発酵乳cを得た。次に得られた発酵乳cを遠心分離機(日立製作所(株)製、20PR52)を用いて3000rpm、10分間の条件でカード画分を遠心分離により除去し乳清100gを回収した。

得られた発酵乳cについて、比較例1と同様な条件で粘度及びACEIペプチド含有量を測定した。結果を表1に示す。但し、粘度測定におけるローター及び測定時間は、高粘度用ローターNo. 3を用いて測定時間60秒で測定した。下記の条件で粘度及びACEIペプチド含有量を測定した。結果を表1に示す。

【0022】

実施例 2

脱脂粉乳(よつ葉乳業(株)製) 1.5 kg を、水 8.5 kg に溶解し、90℃で1分間HTST殺菌した。その後、室温まで冷却して予め前培養しておいたラクトバチルス・ヘルペティカスCM4株を300g接種し、34℃で攪拌速度50rpmにて攪拌しながら30時間発酵させ、乳酸酸度が3.04重量%の発酵乳dを得た。

次に、得られた発酵乳dを連続遠心分離機(日立製作所(株)製、20PR52)を用いて、3000rpm、10分間の条件で、カード画分を遠心分離により除去し、乳清6.4kgを回収した。

得られた発酵乳dについて、比較例1と同様な条件で粘度及びACEIペプチド含有量を測定した。結果を表1に示す。但し、粘度測定におけるローター及び測定時間は、低粘度用ローターNo. 1を用いて測定時間30秒で測定した。

【0023】

【表 1】

発酵乳	粘度(cp)	乳清回収率 (%)	ACEI ペプチド 含有量(mg/100g)
発酵乳 a (比較例 1)	415	25	7.1
発酵乳 b (実施例 1)	4.5	60	9.0
発酵乳 c (比較例 2)	1832	1	10.5
発酵乳 d (実施例 2)	8.1	64	10.8

【書類名】 要約書

【要約】

【課題】安全性が高く、医薬品、機能性食品、健康食品等として使用できるACEIペプチドを高い割合で含む発酵乳及び乳清を高回収率で効率的に得ることができるACEIペプチド含有発酵乳及び乳清の製造法を提供すること。

【解決手段】乳を含む原料を、攪拌しながら乳酸菌発酵させ、アンジオテンシン変換酵素阻害ペプチドを生成させる工程を含むアンジオテンシン変換酵素阻害ペプチド含有発酵乳の製造法、並びに得られた発酵乳を遠心分離及び／又は圧搾濾過し、乳清を分離回収する工程を更に含むアンジオテンシン変換酵素阻害ペプチド含有乳清の製造法。

【選択図】 なし

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[000104353]

1. 変更年月日 1997年 9月 1日

[変更理由] 名称変更

住 所 東京都渋谷区恵比寿西2丁目20番3号

氏 名 カルピス株式会社